DOI:10.11931/guihaia.gxzw201801037

无菌猕猴桃种子采集方法研究

孙菁婕，杨迪，邹婷婷，赵新仕，唐娟，史佳杰，张乃群*

（南阳师范学院生命科学与技术学院，河南南阳 473061）

摘要：无菌的猕猴桃种子是猕猴桃胚乳培养、实生苗微嫁接等技术的基础材料，利用消毒剂灭菌是常用的无菌种子采集手段，应用最广泛的消毒剂为升汞（Mercuric chloride）和次氯酸钠（NaClO）。该文提出了一种新的无菌猕猴桃种子采集方法——无菌搅拌法，为了探索其准确性和应用性，该研究比较了 0.2 %升汞灭菌 20 min、10 %次氯酸钠灭菌 20 min、无菌搅拌法 3 种方式采集无菌猕猴桃种子的效果，及对种子萌发和幼苗形成的影响。结果表明：无菌搅拌法、0.2 %升汞灭菌 20 min 是稳定有效的无菌猕猴桃采集方式，10 %次氯酸钠灭菌 20 min 的采集效果不稳定；在相同的时间内，无菌搅拌法的种子发芽率最高，为 89.90 %，但发芽势较低，均可正常成苗；10 %次氯酸钠灭菌 20 min 的发芽率次之，与无菌搅拌法的种子无显著差异，发芽势和成苗率最高，分别为 47.47 %和 67.86 %，且有打破猕猴桃种子休眠的作用，整体作用类似于赤霉素（GA_3）浸种的效果；0.2 %升汞灭菌 20 min 对猕猴桃种子的萌发有抑制作用，各项指标均显著低于无菌搅拌法种子，且生长缓慢。此外，无菌搅拌法是物理处理，对种子、操作人员、环境均无害。该研究证实了无菌搅拌法的实用性和优势，发现了次氯酸钠在打破猕猴桃种子休眠方面的作用，为其它同类型果实的无菌种子采集提供了参考。

关键词：种子，猕猴桃，无菌，萌发，搅拌

Study on obtaining aseptic seeds of kiwifruit

SUN Jing-Jie，YANG Di，ZOU Ting-Ting，ZHAO Xin-Shi，TANG Juan，SHI Jia-Jie，ZHANG Nai-Qun*

(*College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University,* Nanyang Henan 473061, China)

Abstract: Aseptic seeds of kiwifruit is used to study endosperm culture, micro-grafting and other research that is fundamental tested material. It is a usual way to gather aseptic seeds to use disinfectant to sterilize. Among them, mercuric chloride and NaClO are the most widely used disinfectant. This article showed that aseptic stirring method is a new method to obtain aseptic seeds of kiwifruit. In order to explore accuracy and applicability of aseptic stirring method, kiwifruit seeds were used to study the effects of three methods, including 0.2 % Mercuric chloride sterilization for 20 min, 10 % NaClO sterilization for 20 min, aseptic stirring method, and their effects on seeds germination and plant growth. The results showed that aseptic stirring method and 0.2 % Mercuric chloride sterilization for 20 min are effective and reproductive way of gathering aseptic seeds of kiwifruit. Oppositely, gathering aseptic seeds of kiwifruit which in 10 % NaClO sterilization for 20 min is unstable. The results also showed that the three methods were effective; and at the same time, seeds germination rate of aseptic stirring method was the highest. And the rate was 89.90 %,but its germination energy was lower, sprouts could grow

---

基金项目：河南省科技攻关项目（102102110159）；南阳师范学院 2017 年度研究生创新基金项目（2017CX007）[Supported by the Scientific and Technological Research Project of Henan Province (102102110159); the Graduate Student Innovation Fund Project of Nanyang Normal University in 2017 (2017CX007)]。

作者简介：孙菁婕（1996-），女，甘肃嘉峪关人，本科，从事植物资源保护与利用等研究，（E-mail）myosotics@qq.com。

*通讯作者：张乃群，本科，教授，从事植物资源保护与利用等研究，（E-mail）zhnq@nynu.edu.cn。

healthily; germination rate of seeds with 10 % NaClO sterilization for 20 min was second place, but there was no significant difference in germination rate of seeds between 10 % NaClO sterilization for 20 min and aseptic stirring method, its germination energy and seedling rate were the highest which were 47.47 % and 67.86 % respectively, and could give the seed a premature start and also could break effectively the dormancy of kiwifruit seeds like GA_3; 0.2 % Mercuric chloride sterilization for 20 min inhibited germination of kiwifruit seeds, the various index was significantly lower than aseptic stirring method, sprouts grew slowly, most of the seeds can not develop into young seedlings within the allotted time . In addition, aseptic stirring method is a physical method, insides it is harmless for seeds, workers and environment. The study resulted that the practicality and advantage of aseptic stirring method, and found the ability of NaClO to break the dormancy of kiwifruit seeds, which provided a reference for the obtaining aseptic seeds of other same type of fruits.
Key words：seeds, kiwifruit, aseptic, germination, stirring

种子是种子植物的繁殖体，对延续物种起着重要作用。猕猴桃是猕猴桃科(*Actinidiaceae*)猕猴桃属(*Actinidia*)的多年生藤本植物（吴秀华，2013），原产地在中国，现已在世界范围内广泛种植（Belrose Inc, 2009），果实可口且营养丰富，因维生素 C 含量高而被誉为“水果之王”，根、茎、叶、花均可入药，可谓‘全身是宝’（周玲艳等，2013）。猕猴桃种子数量多、体积小，镶嵌在果肉中，影响果实的口感和部分产品的加工（如果汁等）。为得到无籽猕猴桃果实，许多学者进行了深入的研究。被子植物的胚乳培养是获取不育植株的重要手段，目前已在西番莲（张琴等，2000）、杨桃（吴清等，2002）、枇杷（彭晓军和王永清，2002）等果树研究中广泛应用，猕猴桃的胚乳培养也有很大进展，并且已获得了三倍体植株（林颖等，2012）。猕猴桃种质资源具有丰富的多样性（王发明等，2018），但童期长，基因高度杂合（叶开玉等，2012），现阶段的繁殖手段多为实生嫁接法，周期长且创伤易感染溃疡病。微嫁接技术是组织培养和嫁接技术的结合，目前在葡萄（郝新意，2017）、苹果（周瑞金等，2007）等果树上广泛应用，利用种子在无菌培养基上培育实生苗，再无菌嫁接优良品种，可缩短繁殖周期、提高成活率、避免溃疡病感染。上述两种技术都需要无菌的猕猴桃种子为基础材料。常用的猕猴桃无菌种子是利用消毒剂杀菌获得，升汞、次氯酸钠是使用最多的消毒剂。实际上，猕猴桃正常完整果实的内部是无菌环境，种子被无菌的果肉包裹，也是无菌的。为避免在取种时将种子暴露在有菌环境中，去掉不必要的工作量，直接采集无菌猕猴桃种子，本试验提出了一种新的无菌猕猴桃种子采集方法——无菌搅拌法，避免了使用消毒剂，优化了胚乳培养、微嫁接技术的前期工作。

1 材料与方法

1.1 材料

试验选取 6 个猕猴桃品种的果实为供试材料，分别为‘贵长’、‘红阳’、‘徐香’、‘翠香’、‘Hort 16A’、‘海沃德’，由超市购买或西峡县猕猴桃种植果园采集。

1.2 方法

1.2.1 试验条件

试验所用的培养基均为 MS 培养基，试验地点在南阳师范学院植物培养室，培养基、磁力搅拌子、去离子水、果酱瓶等均用高压蒸汽灭菌锅灭菌，赤霉素用 0.2 μm 的微孔滤膜过滤除菌，温度控制在 25 ℃左右，每天的光照时间为 12 h，光照强度在 1500~2000 lx 之间，试验除了“无菌种子采集方式效果的稳定性测定”这一步外，其余工作均在 12 月份开始。

1.2.2 无菌种子采集

（1）无菌搅拌法。试验中，先选取‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’猕猴桃完全成熟的完整果实，用无菌搅拌法采集种子，具体步骤如下：在超净工作台中，把猕猴桃果实放在无菌滤纸上，先用酒精棉球擦拭果实表面，再用无菌的镊子和手术刀做剥皮处理。剥皮的过程中应多次在酒精灯上灼烧镊子、手术刀与果皮接触的部分，保证其始终无菌。剥皮后的果肉先移放到另一张无菌滤纸上，用灼烧过的手术刀削去表面的果肉，然后放入无菌的果酱瓶中，用无菌镊子捣碎，加入无菌水至果酱瓶体积的三分之二，拧紧瓶盖，置于磁力搅拌器上搅拌 3~5 min，静置，观察种子与果肉的分离状况，再用无菌水冲走果肉碎屑，留下猕猴桃种子。采集的猕猴桃种子在超净工作台上直接接种于 MS 培养基，每个培养基上接种 6 粒，接种 10 个培养基，共接 60 粒种子，20 d 时观察种子的污染状况，记录数据，待第一粒种子萌发后第 20 d 停止观察，记录种子的萌芽是否带菌。无菌搅拌法采集的‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’3 个品种的种子分别标记为 A1、A2、A3。同时，试验设置有菌环境中，用磁力搅拌器搅拌采集的‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’猕猴桃种子作为对照组，分别标记为 CK1、CK2、CK3，与无菌搅拌法采集的种子比较。

为了进一步证实无菌搅拌法的可靠性，试验再选用‘徐香’猕猴桃、‘海沃德’猕猴桃、‘红阳’猕猴桃 3 个品种猕猴桃作为无菌搅拌法的供试材料，获取种子，具体观察记录方式与无菌搅拌法一致。

（2）消毒剂灭菌。试验选用的消毒剂为升汞、次氯酸钠，浓度分别为 0.2 %、10 %，灭菌时间为 20 min，这也是文献中应用过的有效灭菌处理。消毒剂灭菌所用的种子是通过常规取种方式采集的，即选择‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’猕猴桃完全成熟的完整果实，在有菌环境中挤出果肉，利用纱布包裹后反复淘洗，去掉果肉和漂浮于水面的空瘪种子，留下饱满种子。升汞灭菌后的 ‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’种子分别标记为 B1、B2、B3，次氯酸钠灭菌后的‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’种子分别标记为 C1、C2、C3。灭菌后的猕猴桃种子在超净工作台上直接接种于 MS 培养基，每个培养基上接种 6 粒，接种 10 个培养基，共接 60 粒种子，20 d 时观察种子的污染状况，记录数据，待第一粒种子萌发后第 20 d 停止观察，记录种子的萌芽是否带菌。

（3）无菌种子采集方式效果的稳定性测定。为了更好地确定无菌搅拌法和消毒剂灭菌的效果，以‘贵长’猕猴桃的果实为材料，分别用这两种方式在 12 月、1 月、2 月、3 月分别采集一次无菌猕猴桃种子，观察记录方式与上述（1）、（2）一致。

1.2.3 种子萌发培养

培养种子萌发，观察芽的生长状况，主要是用于分析两种无菌种子采集方式各自的优缺点，进一步验证无菌搅拌法的实用性。试验以‘贵长’猕猴桃果实为材料，进行以下研究：

（1）无菌种子的直接培养。试验用无菌搅拌法、0.2 %升汞灭菌 20 min、10 %次氯酸钠灭菌 20 min 采集的无菌种子接种于 MS 培养基，使其自然萌芽生长，以 10 d 为一个单位，观察一次种子的萌发情况，待种子萌发结束后观察成苗情况（长出真叶的芽为成苗），观察时长为 50 d。试验设 3 次重复，每次重复 33 粒左右。

（2）赤霉素处理。试验用无菌搅拌法、0.2 %升汞灭菌 20 min 采集的无菌种子，在浓度为 25 mg·L^{-1} 的赤霉素中分别浸种 0 h、5 h、8 h、15 h、20 h、24 h，无菌搅拌法种子按顺序标记为 D1、D2、D3、D4、D5、D6，升汞灭菌的种子按顺序标记为 D7、D8、D9、D10、D11、D12。经赤霉素处理后的无菌种子于 MS 培养基上培养，观察记录种子的萌发、生长等情况，时长为 50 d。试验设 3 次重复，每次重复 31 粒左右。

发芽率=最终发芽的种子数/供试种子数×100 %；

发芽势=试验前 20 d 发芽种子数/供试种子数×100 %；

成苗率=试验结束时萌芽的成苗数/供试种子数×100 %。

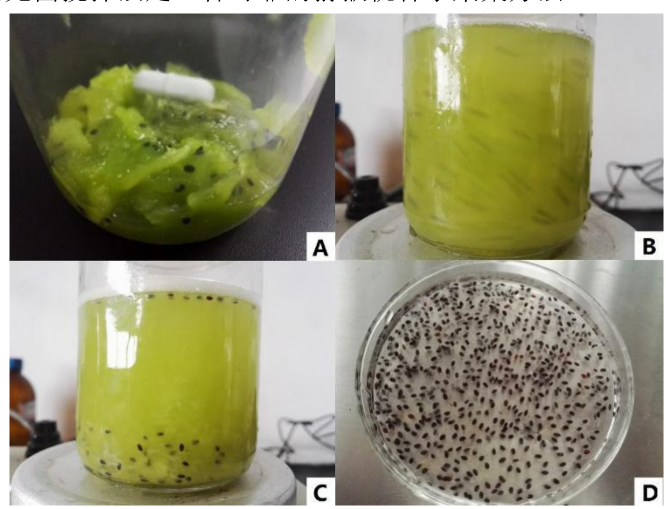
1.2.4 统计学分析

试验采用 Excel 2013 整理数据和制作图表，SPSS 22.0 统计软件作统计学分析，利用 one-way ANOVA Duncan 法完成多重比较。

2 结果与分析

2.1 无菌搅拌法的无菌猕猴桃种子采集效果

无菌搅拌法可顺利采集猕猴桃种子（图 1：A、D），搅拌果肉时可清楚观察到种子与果肉分离（图 1：B），静置后饱满的种子沉在果酱瓶底部，空瘪种子漂浮在去离子水上部（图 1：C），表明无菌搅拌法是一种可靠的猕猴桃种子采集方法。



注：A.含有种子的果肉；B.加水搅拌；C.果肉和种子分离；D.猕猴桃种子。

Note: A. pulp containing seeds; B. stirring with water; C. separating pulp and seeds; D. seeds of kiwifruit.

图 1 无菌搅拌法采集猕猴桃种子的过程

Fig.1 Aseptic stirring method to obtain seeds of kiwifruit

利用无菌搅拌法采集‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’3 个猕猴桃品种无菌种子的效果如表 1 所示：3 个品种的对照组种子全部污染，确认污染的时间在 3~10 d 之间；无菌搅拌法采集的 3 个猕猴桃品种种子接种于 MS 培养基，经 20 d 的观察，‘贵长’、‘Hort 16A’2 个品种各有 1 粒种子污染，确认污染的时间分别在第 7 d、第 6 d，‘翠香’的种子无污染产生。3 个品种的对照组由于种子全部污染，因此无萌芽产生，而无菌搅拌法组中，3 个品种的种子开始萌发时间并无显著差异，均在 13~16 d 之间，因此对萌芽污染情况的观察时间统一至第 36 d 结束，所有的种子萌芽均不带菌。可见，无菌搅拌法是可以用来采集无菌猕猴桃种子的，试验中出现的 2 粒种子污染应该是试验操作不严谨造成的。

表 1 无菌搅拌法采集‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’猕猴桃无菌种子的效果

Table 1 the effect of aseptic stirring method to obtain aseptic seeds of ‘Guichang’, ‘Hort 16A’ and ‘Cuixiang’

序号 Sequence number	种子污染数 Number of seeds contamination	萌芽带菌数 Number of sprouts contamination
CK1	60	—
CK2	60	—
CK3	60	—
A1	1	0

A2	1	0
A3	0	0

为了确认表 1 中试验中出现的 2 粒种子污染不是方法本身的问题，试验选用‘徐香’、‘红阳’、‘海沃德’3 个猕猴桃品种为材料，再次利用无菌搅拌法取种，具体采集效果如表 2 所示：采集的 3 个猕猴桃品种种子是无菌的，经 20 d 观察，无污染产生，种子的开始发芽时间为‘徐香’约在第 14 d，‘红阳’约在第 16 d，‘海沃德’约在第 14 d，因此对萌芽的观察时间分别持续至第 34 d、36 d、34 d，种子的萌芽也无污染现象。可见，表 1 中的 2 粒种子污染与无菌搅拌法本身并无关联，无菌搅拌法是一种可靠的无菌猕猴桃种子采集方法。

表 2 无菌搅拌法采集‘徐香’、‘红阳’、‘海沃德’猕猴桃无菌种子的效果

Table 2 the effect of aseptic stirring method to obtain aseptic seeds of ‘Xuxiang’, ‘Hongyang’ and ‘Hayward’

序号 Sequence number	种子污染数 Number of seeds contamination	萌芽带菌数 Number of sprouts contamination
‘徐香’ ‘Xuxiang’	0	0
‘红阳’ ‘Hongyang’	0	0
‘海沃德’ ‘Hayward’	0	0

2.2 消毒剂灭菌采集无菌猕猴桃种子的效果

消毒剂灭菌采集无菌猕猴桃种子的效果如表 3 所示：对于‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’3 个品种的种子，经 0.2 %升汞处理 20 min 和 10 %次氯酸钠处理 20 min 后在 20 d 内均无细菌或真菌污染，每种处理的 60 粒种子都是无菌的。0.2 %升汞处理 20 min 后的种子开始发芽较晚，‘贵长’约在第 17 d，‘Hort 16A’ 约在第 18 d，‘翠香’约在第 16 d，对萌芽污染情况的观察分别至第 27 d、28 d、26 d 结束，萌芽均不带菌。10%次氯酸钠处理 20 min 后的种子开始发芽有所时间提前，‘贵长’约在第 11 d，‘Hort 16A’ 约在第 12 d，‘翠香’约在第 11 d，对萌芽污染情况的观察分别至第 21 d、22 d、21 d 结束，萌芽均不带菌。可见，消毒剂灭菌也能采集无菌猕猴桃种子。

表 3 消毒剂灭菌采集‘贵长’、‘Hort 16A’、‘翠香’猕猴桃无菌种子的效果

Table 1 the effect of disinfectant sterilization to obtain aseptic seeds of ‘Guichang’, ‘Hort 16A’ and ‘Cuixiang’

序号 Sequence number	种子污染数 Number of seeds contamination	萌芽带菌数 Number of sprouts contamination
B1	0	0
B2	0	0
B3	0	0
C1	0	0
C2	0	0
C3	0	0

2.3 不同无菌猕猴桃种子采集方式效果的稳定性

不同无菌猕猴桃种子采集方式效果的稳定性测定效果如表 4 所示：无菌搅拌法在 12 月

采集的无菌‘贵长’猕猴桃种子有 1 粒污染，其余 3 个月无污染；0.2 % 升汞 20 min 处理在 4 次无菌‘贵长’猕猴桃种子采集中均无污染产生；10 % 次氯酸钠 20 min 处理在 12 月、1 月两次无菌‘贵长’猕猴桃种子采集中无污染现象，而在 2 月时有 7 粒污染，3 月有 13 粒种子污染。在 2.1 中已经证明‘贵长’猕猴桃的那 1 粒种子污染与无菌搅拌法本身无关，因此无菌搅拌法和 0.2 % 升汞 20 min 处理都是效果比较稳定的猕猴桃无菌种子的采集方式，10 % 次氯酸钠 20 min 处理 2 月、3 月两次的无菌种子采集效果与前两者有明显差异，可参考性不强。

表 4 不同时间无菌‘贵长’猕猴桃种子采集方式的效果

Table 4 the effect of aspetic ‘Guichang’ kiwifruit seeds obtaining methods in different times

处理 treatment	12 月 December	1 月 January	2 月 February	3 月 March
无菌搅拌法种子污染数 Number of seeds contamination of aseptic stirring method	1	0	0	0
0.2 %升汞 20 min 种子污染数 Number of seeds contamination of 0.2 % mercuric chloride 20 min	0	0	0	0
10 %次氯酸钠 20 min 种子污染数 Number of seeds contamination of 10 % NaClO 20 min	0	0	7	11

2.4 不同无菌种子采集方式对‘贵长’猕猴桃种子发芽及成苗的影响

如图 2 所示，消毒剂灭菌和无菌搅拌法采集的无菌‘贵长’猕猴桃种子的发芽是在 10~40 d 之间，0~10 d 之间无种子萌发，40~50 d 之间发芽率基本无变化。10 %次氯酸钠灭菌 20 min 的种子开始萌发时间约在第 11 d，11~20 d 之间发芽率就达到了 47.47 %，到 30 d 时发芽率为 53.53 %，而 30~40 d 间才有 29.80 %的种子发芽；无菌搅拌法采集的无菌种子约在第 15 d 开始萌发，30~40 d 之间的种子发芽率为 57.81 %，而前 30 d 只有 32.09 %，后期发芽率接近于前期的 2 倍；0.2 %升汞灭菌 20 min 后的种子开始萌发时间较晚，约在第 17 d，前 30 d 的发芽率 19.19 %，40 d 时的最终发芽率为 46.46 %，整体种子发芽率显著低于无菌搅拌法和 10 %次氯酸钠灭菌 20 min（图 1，表 5，$P<0.05$），种子开始萌发的时间约比无菌搅拌法晚 2 d，比 10 %次氯酸钠灭菌 20 min 晚 6 d，可见，无菌搅拌法种子的发芽高峰时段为试验后期，开始萌发时间较晚，说明‘贵长’猕猴桃种子有休眠性；10 %次氯酸钠灭菌 20 min 的种子发芽高峰时段是在试验前期，且开始萌发时间提前无菌搅拌法种子 4 d，说明 10 %次氯酸钠灭菌 20 min 有助于‘贵长’猕猴桃种子的破眠；0.2 %升汞灭菌 20 min 的种子各方面指标都低，开始萌发时间最晚，说明 0.2 %升汞灭菌 20 min 会抑制‘贵长’猕猴桃种子的萌发。

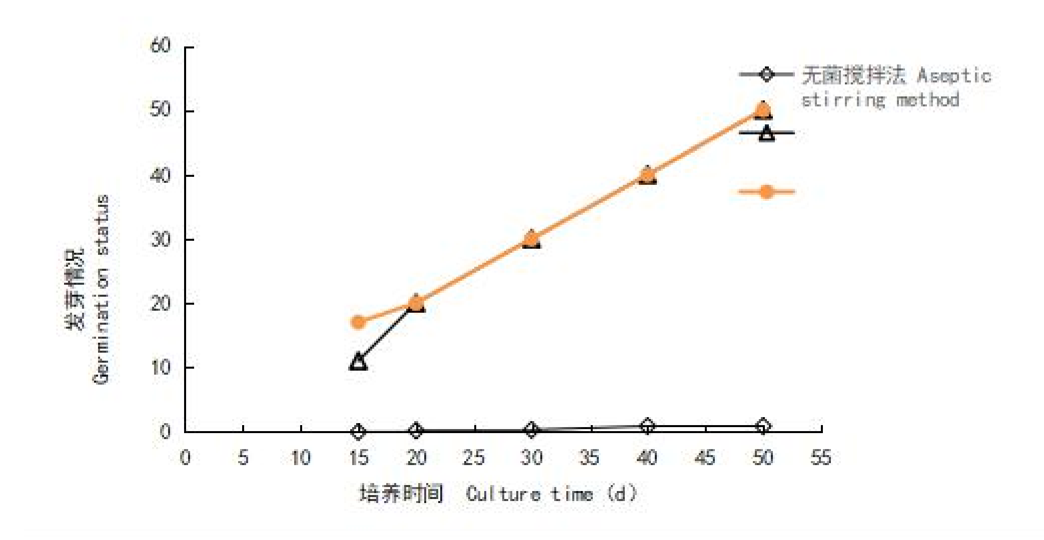


图 2 不同无菌种子采集方式对‘贵长’猕猴桃种子发芽的影响

Fig.2 the effect of different aspect seeds obtaining methods to germination of ‘Guichang’ kiwifruit seeds

表 5 不同方式采集的‘贵长’猕猴桃无菌种子 40 d 时的最终发芽率

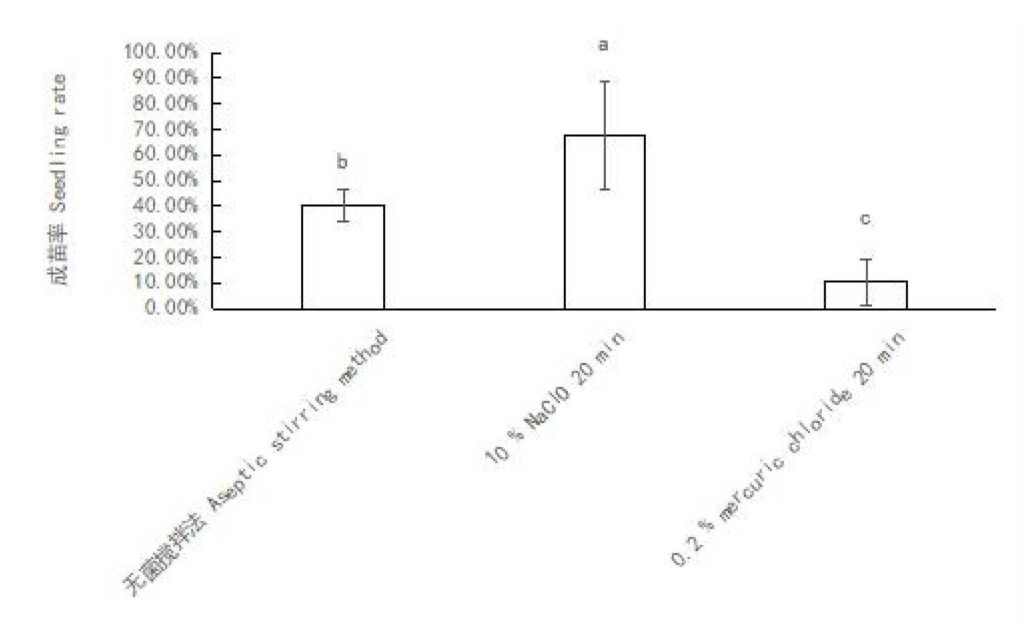
Table 5 the final germination rate of ‘Guichang’ kiwifruit aspect seeds in different obtaining methods for 40 d

处理 treatment	最终发芽率 final germination rate（%）
无菌搅拌法 Aseptic stirring method	89.90a
0.2 %升汞 20 min 0.2 % mercuric chloride 20 min	46.46b
10 %次氯酸钠 20 min 10 % NaClO 20 min	83.33a

注：同列不同字母表示差异显著（P<0.05）。

Note: Different letters in the column indicate significant difference（P<0.05）.

试验在 50 d 时结束后，不同方式采集的无菌猕猴桃种子的成苗情况也存在显著差异（P<0.05），如图 3 所示。10 %次氯酸钠灭菌 20 min 的种子成苗率最高，为 67.86 %，开始萌发后 3 d 左右就有子叶出现，第 22 d 左右，长出子叶的萌芽大部分会长出真叶，30 d 时萌芽的根长均在 1.5~3.0 cm 之间。0.2 %升汞灭菌 20 min 的种子成苗率最低，种子萌发后芽生长缓慢，在 26 d 左右才出现子叶，成苗率只有 10.33 %。无菌搅拌法种子萌发后，第 19 d 左右会开始出现子叶，第 24 d 开始长出子叶的芽陆续有真叶舒展开来，30 d 时的根长为 1~2 cm 之间，成苗率为 40.07 %。从整个生长过程来看，10 %次氯酸钠灭菌 20 min 的种子生长最为旺盛，最先生根、长出子叶、成苗，根系也最发达（图 4：左 2）；无菌搅拌法种子长势良好，从露白到长出子叶，再到长出真叶，所需时间和 10 %次氯酸钠灭菌 20 min 的种子无明显差异，根健壮，分根多，由于开始萌发时间晚，规定时间内成苗率不及次氯酸钠处理（图 4：左 1）；0.2 %升汞灭菌 20 min 的种子萌发、生长状况都很差，许多种子虽然萌发，会长出一点根，但到试验结束基本无变化，一小部分会长出子叶和真叶，成苗率显著低于前两者（P<0.05），规定时间内成苗的芽根细且短小，分根少（图 4：左 3）。可见，从获取实生苗的角度看，10 %次氯酸钠灭菌 20 min 显然效果更好，无菌搅拌法也能获得健壮的实生苗，两者的差异主要体现在种子开始发芽的时间上。



注：图中不同字母表示差异显著（*P*<0.05）。

Note: Different letters in the figure indicate significant difference（*P*<0.05）.

图 3 不同方式采集的无菌猕猴桃种子的成苗情况

Fig.3 Seedling status of aspect kiwifruit seeds in different obtaining methods



注：自左至右依次为“无菌搅拌法”；“10 %次氯酸钠灭菌 20 min”；“0.2 %升汞 灭菌 20 min”；“赤霉素处理 8 h”；“0.2 %升汞灭菌 20min 后赤霉素再处理 24 h”5 种种子在 50 d 时的成苗。

Note: From left to right is ‘aseptic stirring method’; ’10 % NaClO 20 min’; ‘0.2 % Mercuric chloride 20 min’; ‘GA_3 8 h’; ‘GA_3 24 h after 0.2 % mercuric chloride 20 min’ 5 kinds of seeds seedling for 50 d.

图 4　50 d 时‘贵长’猕猴桃种子的成苗

Fig.4 Seedling of ‘Guichang’ kiwifruit seeds

2.5 赤霉素浸种对不同方式采集的无菌猕猴桃种子萌发的影响

赤霉素浸种对不同方式采集的无菌猕猴桃种子萌发的影响如表 6 所示。与 D1、D7 两个对照相比，赤霉素浸种的 5 个处理均促进了‘贵长’猕猴桃种子萌发，发芽高峰时段也

提前至试验前期（11~20 d）、中期（20~30 d）。无菌搅拌法种子的 D3~D6 处理发芽率均达到 100 %，D2 处理也达到了 95.70 %，高于对照；发芽势 D3 处理最高，为 82.79%，D5 处理也达到 81.72 %，两种处理的发芽速度和发芽整齐度无显著差异； D5 处理的成苗率为 96.77 %，略微超过 D3 处理的 94.62 %（图 4：左 4），两者并无显著差异（P＜0.05），但 D3 处理的浸种时间比 D5 处理少 12 h。可见，D3 即赤霉素浸种 8 h 是‘贵长’猕猴桃种子的最佳的浸种时间。浸种时间最短的 D2 处理，3 个指标均处于一般水平，而浸种时间最长的 D6 处理，发芽势、成苗率却最低，和 D3、D4、D5 都有显著差异（P＜0.05），发芽高峰时段也有所推迟。可见，赤霉素的破眠作用只是在一定的范围内有效。0.2 %升汞灭菌 20 min 的种子经赤霉素浸种后，D11 处理发芽率最高，为 94.62 %，D10 发芽势最高，为 50.54 %，D12 成苗率最高，为 70.05 %（图 4：左 5），显著低于除 D6、D1 外所有的无菌搅拌法浸种处理（P＜0.05）。可见，即使打破种子的休眠，0.2 %升汞灭菌 20 min 依然不利于种子的萌发、生长，这也从另一方面印证了 2.4 的结论。

综上所述，适当利用赤霉素浸种在打破猕猴桃种子休眠上有很好的作用，试验中探索出的最佳方案为 25 $mg·L^{-1}$ 的赤霉素浸种 8 h。

表 6 赤霉素处理时间对不同方式采集的无菌‘贵长’猕猴桃种子发芽率、发芽势、成苗率的影响

Table 6 the effect of germination rate, germination energy, seedling rate of aspetic ‘Guichang’ kiwifruit seeds in different obtaining methods in GA_3 soaking seeds time

序号 Sequence number	发芽高峰时段 Peak period of germination（d）	发芽率 Germination rate（%）	发芽势 Germination energy（%）	50d 成苗率 Seedling rate for 50 d（%）
D1	30~40	89.90±9.74ab	19.19±12.25fg	40.07±6.24e
D2	11~20	95.70±4.93ab	52.69±10.37bc	75.02±8.14bcd
D3	11~20	100±0a	82.79±8.11a	94.62±1.86ab
D4	11~20	100±0a	55.91±4.93b	87.10±19.62abc
D5	11~20	100±0a	81.72±1.86a	96.77±3.23a
D6	20~30	100±0a	22.58±5.59efg	54.84±14.06de
D7	30~40	46.46±4.63d	11.11±1.75g	10.33±9.20f
D8	20~30	93.55±3.23ab	25.81±3.23defg	64.46±4.04d
D9	20~30	74.19±19.62c	38.71±8.54cde	60.05±18.21de
D10	20~30	89.24±15.91ab	50.54±14.90bc	68.55±17.52cd
D11	20~30	94.62±1.86ab	30.11±1.86def	63.72±10.56d
D12	20~30	82.80±1.86bc	40.86±17.76bcd	70.05±5.24cd

注：同列中不同字母表示差异显著（P＜0.05）

Note: Different letters in the column indicate significant difference（P＜0.05）.

3 讨论

采集无菌种子时，采集方式的效果、种子活性的保持、附带问题的存在和解决是必须考虑的三大因素。试验结果表明，无菌搅拌法、消毒剂灭菌都可有效采集无菌的猕猴桃种子，但消毒剂中的次氯酸钠灭菌效果不稳定，在天气较冷的 12 月、1 月灭菌效果很好，在天气转暖的 2 月、3 月灭菌效果较差，王羽悦（王羽悦，2016）在探索猕猴桃茎段的最佳取材时间时发现季节转换对茎段的污染有影响，天气转暖会导致污染率的上升。升汞处理之所以能够保持良好的灭菌效果，是因为试验中使用的浓度较高、浸种时间较长，而在其它外植体灭菌时，常用的升汞浓度为 0.1 %，灭菌时间在 15 min 以内，浓度过高、时间过长会抑制外植体的活性（何官榕等，2017），陈雪鹛等（2012）在做芙蓉菊组培时、蒋时姣

等（2014）在采集柳杉无菌种子时的灭菌探索都印证了此结论。0.2 %升汞灭菌 20 min 是众多猕猴桃胚乳培养文献中常用的种子灭菌方式（林颖等，2012；龙自立，2008；赵丹丹，2011），灭菌效果好却存在一些附带问题。首先，升汞灭菌的原因在于其含有的 Hg^{2+} 是重金属离子，会与菌体内带有负电荷的蛋白质结合，使蛋白质变性，进而杀灭菌体，但 Hg^{2+}会残留在被灭菌的外植体表面不易清除，影响外植体的存活，林妃等（2013）在做花梨木组织培养时有此结论；其次，汞是一种重金属，对环境污染大，对操作人员有潜在危害，妥善处理升汞废液、避免对人体伤害是不容忽视却又较难解决的问题（Bjørklund G, 2017）。无菌搅拌法是一种物理取种方法，与消毒剂灭菌相比，操作过程简单，不会对猕猴桃种子造成伤害，也不存在环境、安全等附加问题，适合实验室中的无菌猕猴桃种子采集。

种子的休眠是植物在长期的系统发育过程中形成的抵抗外界不良环境条件，以保持物种不断发展和进化的生态特性，是调节种子萌发最佳时机和空间分布的一种机制（郑道君等，2017）。猕猴桃种子体积微小，有一定的休眠特性。低温沙藏法是打破猕猴桃种子休眠常用的方法，一般在冬天开始，时间为 2~3 个月不等，低温沙藏过程中还需控制沙的湿度、种子表面的空气流动等问题（王亚威，2017），整个方法受限条件多，过程繁琐。赤霉素是打破种子休眠的常用试剂（常青山等，2016），本试验在探索无菌搅拌法优势时，利用 25 $mg \cdot L^{-1}$ 的赤霉素浸种，得出一定的浓度下赤霉素浸种促进猕猴桃种子萌发只在一定时间范围内有效的结论，这与周玲艳等（2009）用 2.5 $mg \cdot L^{-1}$ 的赤霉素浸泡美味猕猴桃种子时的结论不谋而合。25 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度的赤霉素浸种 8 h 是本试验中赤霉素浸种的最佳处理。另外，试验中用次氯酸钠灭菌时发现，次氯酸钠亦有打破猕猴桃种子休眠的作用，这可能是因为次氯酸钠腐蚀了猕猴桃种子的种皮，让胚更易吸收外界的水分及无机盐离子。10 %次氯酸钠灭菌 20 min 的种子在开始萌发时间、发芽高峰时段上和赤霉素浸种的最佳处理无差异，两者的差异在于 11~20 d 时种子的发芽数量，赤霉素处理为 82.79 %，次氯酸钠处理为 47.47 %，相差 35.32 %，但都显著高于不做处理的普通种子（无菌搅拌法种子）。因此，25 $mg \cdot L^{-1}$ 赤霉素浸种 8 h 处理的破眠效果优于 10 %次氯酸钠灭菌 20 min 处理。不过，浸种时间短是次氯酸钠的优势，20 min 是 8 h 的 1/24，本研究只是观察了 10 %的次氯酸浸种 20 min 的破眠效果，有一定的片面性，但次氯酸钠的破眠作用是可以肯定的，具体潜力有待进一步探究。

综上所述，升汞灭菌的附带问题较多，最好避免使用；次氯酸钠灭菌的效果不稳定，相比之下，用于打破猕猴桃种子休眠更有意义；无菌搅拌法可避免升汞、次氯酸钠灭菌时的短处，适合用于采集无菌的猕猴桃种子。本试验证实了无菌搅拌法的可靠性和实用性，为采集无菌的猕猴桃种子提供了新的高效、安全的方法，具有较大的实用价值，也为类似植物的无菌种子采集拓展了新思路。

参考文献：

Belrose Inc, 2009. World kiwifruit review. Belrose[M] . Washington: Inc. Pullman, 36- 38.

Bjørklund G, Dadar M, Mutter J, et al, 2017. The toxicology of mercury: Current research and emerging trends[J] . Environ Res, 159: 545.

CHANG QS，ZHANG LX，LIU J，et al，2016. Dormancy mechanism and breaking approaches of *Abutilon theophrasti* seeds [J] . Plant Physiol J, 52 (6): 967- 974. [常青山，张利霞，刘晶，等. 苘麻种子休眠机理及破眠方法[J] . 植物生理学报，52(6): 967- 974.]

CHEN XJ, WU Y, LI XK, et al, 2012. Study on techniques of fast multiplication for the tissue culture of

Crossostephium chinense[J] . J Cent S Univ For & Technol, 32(7): 100- 104+ 127+ 151. [陈雪鹃，吴珏，李雪珂，等，2012. 芙蓉菊组培快繁技术的研究[J] . 中南林业科技大学学报， 32(7): 100-104+127+151.]

HAO XY, 2017. Histological study, virus movement and detection *in vitro* micrografting of grapevine[D] . Yangling: Northwest A & F Univ: 2- 4. [郝新意，2017. 葡萄试管苗微型嫁接组织学、病毒的转运及检测研究[D]. 杨凌：西北农林科技大学：2- 4.]

HE GR, ZHANG WC, HE BZ, et al, 2017. Aseptic germination of *Ormosia hosiei* [J] . J Fujian Agric & For Univ (Nat Sci Ed), 46(6): 623- 629. [何官榕，张文春，何碧珠，等，2017. 鄂西红豆树种子的无菌萌发[J] . 福建农林大学学报(自然科学版)，46(6): 623- 629.]

JIANG SJ, ZHONG Y, ZHANG F, et al, 2014. Establishment of Rapid Propagation for Sterile Seedlings of *Cryptomeria fortunei* by Tissue Culture[J] . Plant Physiol J, 50(7): 1039- 1044. [蒋时姣，钟宇，张帆，等，2014. 柳杉种子无菌苗组培快繁体系的建立[J]. 植物生理学报，50(7): 1039- 1044.]

LIN F, WANG BZ, HUANG DM, et al, 2017. Management of tissue cultured plants of *Dalbergia odorifera* T. Chen[J] . Chinese J Trop Agric, 37(8): 26- 27. [林妃，王必尊，黄东梅，等，2017. 花梨木组培苗育苗管理技术[J] . 热带农业科学，37(8): 26- 27.]

LIN Y， LONG ZL， ZHANG L， et al2012. Optimum technological parameters for regeneration system of endosperm of *Actindia chinese* CV．‘JINTAO’ [J] . J Nucl Agric Sci, 26(2)：257- 261+ 310. [林颖，龙自立，张璐，等，2012. 猕猴桃胚乳再生植株体系的优化[J] . 核农学报，26(2)：257- 261+ 310.]

LONG ZL，2008. Study on in vitro regeneration and variation induction of *Actindia*[D] . Hangzhou：Zhejiang Univ：31- 33. [龙自立，2008. 猕猴桃离体再生与变异诱导的研究[D] . 杭州：浙江大学：31- 33.]

PENG XJ, WANG YQ, 2002. Callus induction and plant regeneration from Endosperm of Loquat[J] . J Sichuan Agric Univ, 20(3): 228-231. [彭晓军，王永清，2002．枇杷胚乳愈伤组织诱导和不定芽发生的研究[J] ．四川农业大学学报，20(3): 228-231.]

WANG FM, LI JW, HU YK, et al, 2018. Chromosome ploidy of ten species in genus *Actinidia*[J] . Guihaia, 38(2): 220- 224. [王发明，李洁维，胡亚康，等，2018. 猕猴桃属十个种的染色体倍性鉴定[J]. 广西植物，38（2）：220- 224.]

WANG YW, 2017. Study on nutrition pot finished seedling propagation of kiwifruit in greenhouse[D] . Yangling: Northwest A& F Univ: 12- 14. [王亚威，2017. 猕猴桃温室营养钵成品苗繁育技术试验研究[D] . 杨凌：西北农林科技大学：12- 14.]

WANG YY, 2016, Tissue culture and rapid propagation of Kiwi[D] . Yangling: Northwest A& F Univ: 22- 25. [王羽悦，2016. 猕猴桃组织培养快速繁育技术研究[D] . 杨凌: 西北农林科技大学：22- 25.]

WU Q, YAN Y, LIANG GL, 2002. Callus induction and plant regeneration from endosperm culture of *Averrhoa carambola*[J] . Chinese J Trop Crops, 23(2): 54- 57. [吴清，闫勇，梁国鲁，2002．红杨桃胚乳愈伤组织的诱导和三倍体植株再生[J] ．热带作物学报，23(2): 54- 57.]

WU XH, ZHANG YL, ZHOU Y, et al, 2013. Establishment of high frequency and direct regeneration system from leaf of ‘Hayward’ Kiwifruit [*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang et A. R. Ferguson] [J] . Plant Physiol J, 49(8): 759- 763. [吴秀华, 张艳玲, 周月, 等, 2013. ‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立[J]. 植物生理学报, 49(8): 759- 763.]

YE KY, LI JW, JIANG QS, et al, 2012. Search for proper dose of ^{60}Co-γ ray in *Actinidia chinensis* radiation breeding [J] . Guihaia, 32(5): 694- 697. [叶开玉，李洁维，蒋桥生，等，2012. 猕猴桃 ^{60}Co-γ射线辐射诱变育种适宜剂量的研究[J] . 广西植物，32（5）：694- 697.]

ZHANG Q, YAN Y, LIANG GL, 2000. Callus induction and triploid plant regeneration from endosperm of *passiflora edulis*[J] . J Southwest Agric Univ, 22(5): 398- 402. [张琴，闫勇，梁国鲁，2000．西番莲胚乳愈伤组织诱导和三倍体植株再生[J] . 西南农业大学学报，22(5): 398- 402.]

ZHAO DD, 2011. Studies on endosperm culture and ploidy variations of kiwifruit[D] . Hangzhou： Zhejiang Univ: 32- 34. [赵丹丹，2011. 猕猴桃胚乳培养与倍性变异的研究[D] . 杭州：浙江大学：32- 34.]

ZHENG DJ, YANG LR, YUN Y, et al, 2017. Seed dormancy mechanism and its ecological significance of endangered species *Dracaena cambodiana* [J] . Guihaia, 37(12): 1551- 1559. [郑道君，杨立荣，云勇，等，2017. 濒危植物海南龙血树种子休眠机理及其生态学意义[J] . 广西植物，37(12): 1551- 1559.]

ZHOU LY, PAN WM, WU YY, et al, 2013. Study on morphological characteristics of tricotyledon mutant of kiwifruit[J] . Guihaia, 33(4): 547－551. [周玲艳，潘伟明，伍宇雁，等，2013. 猕猴桃三子叶突变体的形态特征研究[J] . 广西植物，33(4): 547- 551.]

ZHOU LY, QIN HM, LAI XY, et al, 2009. Establishment of regeneration system of kiwifruit seedlings[J] . Guihaia, 29(4): 514- 517. [周玲艳，秦华明，赖幸韵，等，2009. 猕猴桃实生苗再生体系的建立[J] . 广西植物，29(4): 514-517.]

ZHOU RJ, DU GQ, SHI XX, et al, 2007. Studies on factors affecting survival rate of micro- graft in vitro in transgenic apple[J] . J Fruit Sci, 24 (2): 215- 217. [周瑞金，杜国强，师校欣，等，2007. 影响转基因苹果试管微嫁接苗成活的因子[J] . 果树学报，24(2): 215- 217.]